

BERENJENOL AISLADO DE *Oxandra cf xylopioides* (ANNONACEAE) COMO INSECTICIDA

BERENJENOL ISOLATED FROM *Oxandra cf xylopioides* (ANNONACEAE) AS INSECTICIDE

Benjamin A. ROJANO^{1*}, Carlos A. GAVIRIA M.¹, Jairo A. SÁEZ V.², Francisco YEPES³,
Felipe MUÑOZ³ y Felipe OSSA³.

Recibido: Agosto 31 de 2007 Aceptado: Octubre 22 de 2007

RESUMEN

El Berenjenol (21:24-epoxi-24-metil-cicloartano), obtenido del extracto de diclorometano de las hojas de *Oxandra cf. xylopioides*, es evaluado como biocida sobre el gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda*. El berenjenol es usado en concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 400 ppm y aplicado en una dieta artificial sobre larvas del segundo instar. Se determina el porcentaje de mortalidad a las 24, 48 y 72 horas y se calcula la DL_{50} y DL_{90} ; el análisis de mortalidad demuestra que el berenjenol tiene un efecto tóxico, siendo la dosis de 400 ppm la más mortal. El efecto del berenjenol es muy rápido y efectivo encontrándose valores de DL_{50} de 319.6 ppm a las 24 horas y valores similares a las 48 y 72 horas.

Palabras clave: Berenjenol, *Spodoptera*, Insecticida, *Oxandra*, Cicloartano.

ABSTRACT

Berenjenol (21:24-epoxy-24-methyl-cycloartane) extracted from the leaves of *Oxandra cf. Xylopioides*, is evaluated as a biocide on *Spodoptera frugiperda*. Berenjenol is used at 25, 50, 100, 200 and 400 ppm, and is applied in an artificial diet of larvae in the second instar. The mortality percentage is determined at 24, 48 and 72 hours and LD_{50} and DL_{90} are calculated; the mortality analysis shows that berenjenol has a toxic effect, being the most mortal dose at 400 ppm. The effect of berenjenol is fast and effective, finding DL_{50} at 319.6 ppm after 24 h and similar values at 48 and 72 hours.

Keywords: Berenjenol, *Spodoptera*, Insecticide, *Oxandra*, Cycloartane.

1 Laboratorio de Ciencia de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias. A.A. 3840, Medellín, Colombia.

2 Universidad de Antioquia. Instituto de Química, A.A. 1226, Medellín, Colombia.

3 Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A.A. 1779, Medellín, Colombia

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: brojano@unal.edu.co

INTRODUCCIÓN

Las especies pertenecientes al género *Spodoptera* son polípagos y constituyen un serio problema en los diversos cultivos del mundo. Por ejemplo, uno de los factores limitantes en la producción de maíz (*Zea mays*) en Colombia es el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*, el cual ataca también los cultivos de soya, algodón, arroz, pastos, caña de azúcar, frijol y tabaco, ocasionando daños directos o indirectos, y actúa como trozador, comedor de follaje y de mazorcas en el primer vegetal. Este insecto está distribuido por todo el continente americano y puede encontrarse desde el nivel del mar hasta los 2600 m de altitud (1).

Los insecticidas sintéticos usados para el control de esta plaga, tales como endosulfan, carbofuran, metamidofos y clorpirifos (clorinado, carbamato y órganofosforados, respectivamente), ocasionan efectos negativos sobre la fauna benéfica e interfieren con el equilibrio biológico (2). En los últimos años se han usado insecticidas naturales que afectan el metabolismo y los comportamientos alimentarios de las plagas. Hay un gran interés en la aplicación de metabolitos secundarios para el manejo de artrópodos plagas, específicamente compuestos nuevos biodegradables, pero biológicamente activos, productos naturales con baja toxicidad en mamíferos (3-7).

Los triterpenos, como el limonoide gedunina aislado de *Trichilia roka* (Meliaceae), es un compuesto de baja toxicidad, pero posee fuerte efecto sobre insectos (8,9). Otros triterpenoides importantes en la regulación del crecimiento de los insectos son los fitoesteroides tales como β -ecdisona, ajugasterona C y ciaesterona (10). En el extracto de semillas de *Sandoricum koetjape* se aislaron los limonoides sandoricina e hirosandoricina G, que al incorporarlos en la dieta de *Spodoptera frugiperda* y *Ostrinia nubilalis*, produjeron disminución en el desarrollo, y cuando se aumentó la dosis se incrementó la mortalidad (11).

Los esteroides y triterpenos tienen una importante función biológica y son compuestos claves en la adquisición de colesterol por parte de los insectos, debido a que estos artrópodos no tienen capacidad para la síntesis de novo de esteroles, dependen únicamente de las fuentes exógenas para su normal crecimiento, desarrollo y reproducción (12). Investigaciones sobre el mecanismo de acción de respuestas

aleloquímicas para el control de insectos indican que los triterpenoides están involucrados en actividades insecticidas y reguladoras del crecimiento (13, 14). Estas sustancias son inhibidores del metabolismo y de algunos sistemas enzimáticos (15).

La Annonaceae es una familia de las Angiospermas del orden Magnoliales. Consta de 130 géneros con unas 2300 especies que se distribuyen por los trópicos del Nuevo y Viejo Mundo, hasta el norte de Australia y las islas del Pacífico (16). Murillo en 2001 (17), reporta para Colombia alrededor de 240 especies pertenecientes a 30 géneros. En el género *Oxandra* se han encontrado 10 especies en la región neotropical. En el género *Oxandra* sólo existe informe de 5 especies, y se han encontrado alcaloides tipo bis-dehidroaporfina (18), azaflurenonas (19, 20), monoterpenos (21) y triterpenos (22). En la corteza de *Oxandra xylopioides* Diels, se han aislado solamente alcaloides del tipo azaflurenonas (20).

La especie *Oxandra xylopioides* posee pocos metabolitos secundarios, pero en grandes cantidades. En el extracto etéreo de hojas se aisló el monoterpenoide isoespintanol con un 1.5% en base seca; además, se encontró en el extracto de diclorometano el nuevo cicloartano: 21:24-epoxi-24-metil-cicloartano, de nombre trivial berenjenol (Figura 1) (23). El Berenjenol a 125 mg/kg inhibe el proceso inflamatorio agudo en pata de ratón inducido por carragenina a las 1, 3, 5 h en un 44%, 64% y 51%, respectivamente. El berenjenol a una concentración 100 μ M no produce efectos citotóxicos frente a macrófagos murinos RAW 264.7 (23).

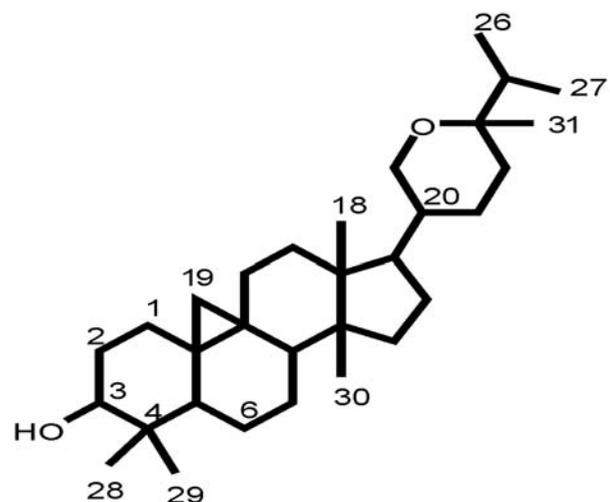


Figura 1. Estructura del Berenjenol.

En este trabajo, se evaluó la acción biocida del Berenjenol sobre *S. frugiperda*, debido a la similitud estructural de este compuesto con triterpenos que han presentado una alta actividad biocida contra insectos en diferentes informes (8-15).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

La especie *Oxandra cf xylopioides* fue colectada en el municipio de Montería (Córdoba, Colombia) e identificada por el botánico Francisco Javier Roldán Palacios. Una muestra con radicado número 037852 se encuentra en el Jardín Botánico Joaquín Antonio Uribe, de Medellín (Colombia).

Extracción y aislamiento

Las hojas secas y molidas (1 kg) fueron extraídas con n-hexano por percolación. El residuo fue re-extraído con diclorometano hasta agotamiento, y el solvente evaporado por evaporación a baja presión. El extracto en CH_2Cl_2 fue fraccionado por cromatografía de columna, usando sílica gel como fase estacionaria (350 g; 8 x 80 cm). El berenjenol (3.0 g, 0.3%) fue recristalizado en metanol, después de diversas cromatografías en columna y fue caracterizado por RMN (^1H y ^{13}C y bidimensionales COSY, NOESY, HMQC, HMBC), EM, UV e IR, junto a diversas propiedades físicas (23).

Material insectil

Para llevar a cabo la evaluación se estableció una cría de *S. frugiperda* con larvas que fueron colectadas en el municipio de Marinilla (Antioquia), en un lote que no había recibido aplicación de agroquímicos. Después de la recolección se individualizaron en copas plásticas de 0.5 onzas, a las cuales previamente se les había agregado 0.5 g de la dieta artificial. La dieta fue cambiada cada 4 días en condiciones asépticas. Obtenidas las pupas, se llevaron en grupos de ocho a frascos de vidrio de 2.000 mL, que sirvieron como cámara de apareamiento y de oviposición para los adultos. Estos últimos fueron alimentados con una solución de miel en agua al 20%. En cada frasco se introdujo una hoja de papel blanco en forma de abanico, para así obtener las masas de huevos puestas por los adultos. Las masas de huevos obtenidas fueron llevadas a recipientes plásticos, a los cuales se

les adicionó dieta para que se alimentaran las larvas de primer instar, luego de la eclosión.

Elaboración de la dieta artificial

La dieta fue elaborada siguiendo la metodología descrita por Cuadros y Vergara 1993 (24), la cual tiene los siguientes componentes: Fríjol (114.0 g, remojados en agua por 24 horas), germen de trigo (50.0 g), levadura (32.0 g), ácido ascórbico (3.3 g), ácido salicílico (2.0 g), ácido sórbico (1.0 g), benzoato de sodio (0.025 g) y 2 mL de formaldehído; toda esta mezcla sólida fue licuada durante 10 minutos. Todo el sólido fue mezclado con una solución de 6.5 g de agar en 325 mL de agua, previamente calentada hasta ebullición. Al final se obtuvo un alimento endurecido, compacto y homogéneo.

Bioensayo

Las larvas de segundo instar fueron individualizadas en las copas plásticas de 0.5 onzas, con dieta. Antes de instalar el bioensayo, se les retiró el alimento por espacio de cinco horas, asegurando que al establecer la evaluación, se alimentaran de la dieta respectiva para cada tratamiento. Después del montaje se realizaron lecturas a las 24, 48 y 72 horas, registrando el porcentaje de mortalidad para cada tratamiento.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo. Se realizaron siete tratamientos, con tres repeticiones, y cada repetición conformada por 10 larvas. Los tratamientos para el Berenjenol fueron dosis de 25, 50, 100, 200 y 400 ppm, incluyendo, además, el testigo absoluto (dieta artificial) y el blanco (dieta artificial + tween 20, etanol y agua destilada). En general, los tratamientos tienen una estructura factorial, que es la forma en que se asignan a las unidades experimentales, en este caso multifactorial, porque involucra los factores dosis del compuesto y el tiempo de evaluación de los experimentos con tres eventos de observación. El análisis estadístico contó con un nivel de significancia $\alpha=0,05$. Obtenidos los resultados, se empleó el Software de Asistencia Estadística SAS[®] versión 8.2 para el análisis del diseño, y para la determinación de las dosis letal 50 (DL_{50}) y de la dosis letal 90 (DL_{90}), a partir del análisis Probit descrito por Gómez (1999) (25), se utilizó el software Statgraphics versión 5.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de efectuados los tratamientos con Berenjenol en las diferentes dosis se calcularon los porcentajes de mortalidad a las 24, 48 y 72 h. En la tabla 1 se presentan los porcentajes de mortalidad para los diferentes tratamientos. Básicamente se observa un aumento gradual de la mortalidad a medida que se incrementa la dosis, diferenciándose a las 24 horas, donde se alcanzaron los mayores porcentajes de mortalidad, valores que no cambiaron mucho en las demás lecturas. Se podría considerar como un indicio del potencial biocida del extracto, por su demostrada eficacia desde el primer tiempo de evaluación (24 horas). Este producto vegetal es capaz de producir la muerte del 50% de la población de *S. frugiperda* expuesta, a las 24 horas, con la dosis máxima (400 ppm). El testigo absoluto y el blanco presentaron los porcentajes de mortalidad más bajos.

Tabla 1. Porcentajes de mortalidad de larvas de *S. frugiperda* según los diferentes tratamientos con berenjenol.

Tratamiento	Repetición	24 horas	48 horas	72 horas
		% mortalidad	% mortalidad	% mortalidad
Testigo absoluto	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	10	10
Blanco	1	0	0	0
	2	0	10	10
	3	0	0	0
25 ppm	1	10	20	20
	2	10	10	10
	3	10	20	20
50 ppm	1	10	10	10
	2	20	20	20
	3	20	20	20
100 ppm	1	10	10	10
	2	30	50	50
	3	30	40	40
200 ppm	1	40	40	40
	2	50	50	50
	3	60	60	60
400 ppm	1	50	50	50
	2	60	60	60
	3	50	50	60

Análisis de varianza

Con el objetivo de buscar explicaciones concretas a los resultados de mortalidad hallados con los diferentes tratamientos, los datos fueron estudiados con modelos mixtos, lo que permite trabajar con la varianza de cada uno de los tratamientos bajo la transformación Arcsen $((\text{porcentaje}/100)+0.01)^{1/2}$. Usando la prueba de normalidad de Shapiro Wilk, se encontró un valor W de 0.896545 y un valor p ($Pr < W$) de 0.07, se cumple el supuesto de normalidad para los datos analizados. En la tabla 2 se presenta el análisis de varianza.

Tabla 2. Análisis de varianza para la variable porcentaje de mortalidad corregida

Efecto	GL Num.	GL Den	Valor F	Pr > F
Tratamiento	11	22.9	11.07	<.0001
Hora	2	64.9	15.77	<.0001
Tratamiento*hora	22	64.9	0.77	0.7462

GL: grados de libertad; F: Coeficiente de Fischer; Pr:

La tabla 2 muestra que la interacción Tratamiento*Hora no resulta estadísticamente significativa, y por tanto, se analizan los efectos principales de los tratamientos y las horas que representan los eventos de observación. Respecto a los tratamientos, el Berenjenol a una concentración de 400 ppm (B400) fue el que causó mayor mortalidad y no se diferencia estadísticamente del tratamiento B200. Sin embargo, en relación a las dosis media y baja, B400 sí presenta diferencias significativas, mostrando ser la concentración más eficiente en la evaluación.

Con respecto a los testigos, se encontró que se presentaron mortalidades que no superaron el 10% y que se diferenciaron estadísticamente del resto de los tratamientos. De esto se puede inferir que el Berenjenol, en sus diferentes dosificaciones, ejerce una acción biocida altamente significativa contra las larvas de *S. frugiperda*. La Figura 2 ilustra los efectos de los tratamientos a las 72 horas, con lo cual se corrobora lo afirmado anteriormente.

Análisis Probit para el establecimiento de la DL_{50} y DL_{90} para el berenjenol

El análisis Probit se modeló en cada momento de lectura, es decir, a las 24, 48 y 72 horas. Para el berenjenol se obtuvieron valores de 18.0167, 13.0236 y 15.2321 y valores $Pr > Chi - Cuadrado$ de 0.0000,

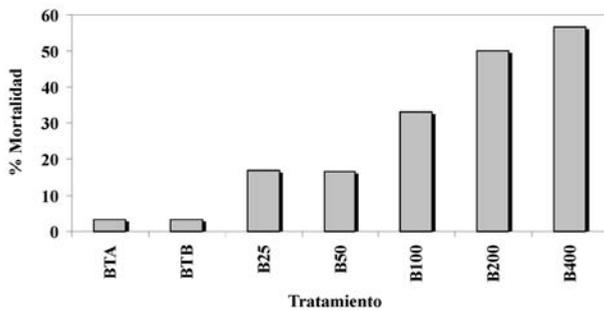


Figura 2. Efectos de los tratamientos con Berenjenol a las 72 horas, con la variable sin transformar.

0.0003 y 0.0001 para cada uno de los tiempos de lectura respectivamente, lo que permite definir que las pruebas de bondad de ajuste para cada tiempo de lectura de la mortalidad por el método de Chi-Cuadrado, son estadísticamente significativas, permitiendo establecer que los datos se ajustan bien al modelo, y por tanto, las DL_{50} y DL_{90} obtenidas son satisfactorias.

En la Tabla 3 se muestran los valores de las dosis letales 50 y 90 a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente, con sus correspondientes intervalos de confianza. Como se puede observar, las dosis letales no variaron considerablemente de una lectura a otra, ratificando que la acción biocida del berenjenol se manifestó prácticamente a las 24 horas, mostrándose poca diferencia entre las 48 y 72 horas de evaluación. En cuanto a la DL_{50} se puede observar que los valores se encuentran entre las dos dosis más altas, es decir, alrededor de las 300 ppm. Con la máxima dosis evaluada (400 ppm) no se obtuvo una mortalidad mayor del 60%, por lo que la DL_{90} es una predicción, haciendo necesario evaluaciones con unas dosis altas para determinaciones más certeras.

CONCLUSIONES

El berenjenol tiene una acción temprana y potente. A las 24 horas postratamiento, el 50% de larvas de *Spodoptera* se mueren cuando son alimentadas con una dieta que contiene 319.6 mg de Berenjenol/kg de dieta, si se compara con blancos sin el compuesto. Estos resultados se corresponden con valores encontrados por Céspedes et al, 2005 (50-300 ppm), para los esteroides como peniocerol, macdougalina y chichipegenina, encontrados en *Myrtillocactus geometrizans* L (Cactaceae). Los compuestos fueron suministrados en una dieta específica, de una manera similar ala usada en nuestro trabajo (26).

Los cicloartanos como el Berenjenol, son inhibidores de tirosinasa, enzima que está involucrada en el proceso de muda de los insectos (27, 28). Además, son inhibidores de acetilcolinesterasa, actuando como neurotóxicos, provocando el atontamiento del insecto, falta de apetencia y muerte (29). De igual manera, los triterpenos están asociados a procesos antialimentarios de insectos, debido a problemas de toxicidad en el proceso de ingestión de los mismos (30, 31). El berenjenol es un compuesto natural alternativo en el uso como antialimentario, específicamente sobre *S. frugiperda*; es importante avanzar en el estudio metabólico del berenjenol y su acción biocida en este insecto.

Se origina la necesidad de evaluar dosis más altas para el berenjenol; además, sería adecuado realizar futuras investigaciones, diseñando tratamientos con dosificaciones mas diferenciadas, para así observar datos de mortalidad con marcadas diferencias estadísticas y que consuzcan a mortalidades cercanas al 100%.

Tabla 3. DL_{50} y DL_{90} a las 24, 48 y 72 horas para el Berenjenol.

DL_{50} y DL_{90} a las 24 horas para el berenjenol.	Dosis Letal (%)	Dosis (ppm)	Intervalos de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
	50	319,61	245,32	477,68
	90	702,03	523,97	1.179,94
DL_{50} y DL_{90} a las 48 horas para el berenjenol.	Dosis Letal (%)	Dosis (ppm)	Intervalos de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
	50	311,47	227,89	521,43
	90	768,87	546,18	1.513,68
DL_{50} y DL_{90} a las 72 horas para el berenjenol.	Dosis Letal (%)	Dosis (ppm)	Intervalos de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
	50	294,13	218,51	460,75
	90	716,51	521,4	1.300,12

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la División de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (DIME, proyecto: 20201006167), a la Vicerrectoría de Investigación, Universidad Nacional de Colombia (Convocatoria Nacional de Investigación) y al programa ECOS-NORD, ICFES, COLCIENCIAS por la financiación del proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- García F, Mosquera M, Vargas C, Rojas L. Control biológico, microbiológico y físico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera Noctuidae), plaga del maíz y otros cultivos de Colombia. *Rev Col Entomol.* 2002; 28(1): 53-60.
- Pérez R, Rodríguez C, Lara J, Montes R, Ramírez G. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Acta Zool Mex.* 2004; 20(1): 141-152.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol.* 2004; 94, 223-253.
- Isman M, Wan A, Passreiter C. Insecticidal activity of essential oils to the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. *Fitoterapia.* 2001; 72: 65-68.
- Passreiter C, Wilson J, Andersen R, Isman M. Metabolism of Thymol and trans-Anethole in Larvae of *Spodoptera litura* and *Trichoplusia ni*. (Lepidoptera: Noctuidae). *J Agric Food Chem.* 2004; 52: 2549-2551.
- Anderson P, Hilker M, Hansson B, Bombosch S, Klein B, Schildknecht H. Oviposition deterring components in larval frass of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae): A behavioural and electrophysiological evaluation. *J Insect Physiol.* 1993; 2: 129-137.
- Regnault R, Hamraoui A. Fumigant toxic activity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera), a bruchid of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Stored Prod Res.* 1995; 31(4), 291-299.
- Arnason JT, Philogéne BJR, Donskov N, Kubo I. Limonoids from the Meliaceae and Rutaceae reduce feeding, growth and development of *Ostrinia nubilalis*. *Entomol Exp Appl.* 1987; 43 (3): 221-226.
- Calderón JS, Céspedes CL, Rosas R, Gómez-Garibay F, Salazar JR, Lina L, Aranda E, Kubo I. (2001) Acetylcholinesterase and insect growth inhibitory activities of *Gutierrezia microcephala* on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. *Z. Naturforschung.* 56: 382-394.
- Kubo I, Klocke JA, Asano S. Insect ecdysis inhibitors from the East African medicinal plant, *Ajuga remota* (Labiateae). *Agric Biol Chem.* 1981; 45: 1925-1927.
- Powell R, Mikolajczak KL, Zilkowski BW, Mantus EK, Cherry D, Clardy J. Limonoid antifeedants from seed of *Sandoricum koetjape*. *Nat Prod.* 1991; 54(1): 241-246.
- Ikekawa N, Morisaki M, Fujimoto Y. Sterol metabolism in insects: dealkylation of phytosterol to cholesterol. *Acc Chem Res.* 1993; 26: 139-146.
- Céspedes CL, Calderón JS, Lina L, Aranda E. Growth inhibitory effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela* spp. (Meliaceae). *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 1903-1908.
- Céspedes CL, Torres P, Marín JC, Arciniegas A, Pérez-Castorena AL, Romo de Vivar A, et al. Insect growth inhibition by tocotrienols and hydroquinones from *Roldanabarbajohannis* (Asteraceae). *Phytochemistry.* 2004; 65 (13): 1963-1975.
- Panzuto M, Mauffette Y, Albert PJ. Developmental, gustatory, and behavioral responses of leafroller larvae, *Choristoneura rosaceana*, to tannic acid and glucose. *J Chem Ecol.* 2002; 28: 145-160.
- Maas PJ, Menega L, Westra TH. Studies in Annonaceae. XXI. Index to species and infrageneric taxa of neotropical Annonaceae. *Candollea.* 1994; 49: 389-481.
- Murillo J. Las Annonaceae de Colombia. *Biota Colombiana.* 2001; 2 (1): 49-58.
- Arango GJ, Cortés D, Cavé A, Kasels B, Mérienne C. Three Bis-Dehydroaporphines from *Oxandra* cf. *Major*. *Phytochemistry.* 1987; 26: 1227-1229.
- Arango GJ, Cortés D, Cavé A. Azafluorenones from *Oxandra* cf. *major* and biogenetic considerations. *Phytochemistry.* 1987; 26: 2093-2098
- Zhan J, Abdel-Rahman O, El-Shabradwy A, El-Shanawany MA, Schiff PL, Slatkin D. New Azafluorene alkaloids from *Oxandra xylopioides*. *J Nat Prod.* 1987; 50: 800-806.
- Hocquemiller R, Cortés D, Arango GJ, Myint S, Cavé A, Angelo A, et al. Isolement et synthèse de l'espintanol, nouveau monoterpène antiparasitaire. *J Nat Prod.* 1991; 54: 445-452.
- Winston FT, Lynn CB. Terpenoid constituents of *Oxandra asbeckii*. *J Nat Prod.* 1992; 55: 701-706.
- Rojano B, Pérez E, Figadère B, Martín MT, Recio MC, Giner R, et al. Constituents of *Oxandra* cf. *xylopioides* with anti-inflammatory activity. *J Nat Prod.* 2007; 70(5): 835-838
- Cuadros M, Vergara R. Estudios básicos sobre la efectividad insecticida de extractos florales de *Calliandra* spp. (Mimosaceae) sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. [Tesis Doctoral] Universidad del Tolima, Ibagué. 1993. p. 92.
- Gómez, H. Algunos métodos estadísticos para el estudio de poblaciones de organismos. Medellín: Universidad Nacional de Colombia: Centro de Publicaciones. 1999. p. 216.
- Céspedes CL, Aranda E, Salazar R, Martínez M. Insect growth regulatory effects of some extracts and sterols from *Myrtillocactus geometrizans* (Cactaceae) against *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor*. *Phytochemistry.* 2005; 66: 2481-2493.
- Hassan Khan M, Choudhary M, Rahman A, Mamedova R, Agzamova M, Sultankhodzhaev M, et al. Tyrosinase inhibition studies of cycloartane and cucurbitane glycosides and their structure–activity relationships. *Bioorg Med Chem.* 2006; 14: 6085-6088.
- Hassan Khan M, Khan SB, Ather A. Tyrosinase inhibitory cycloartane type triterpenoids from the methanol extract of the whole plant of *Amberboa ramosa* Jafri and their structure–activity relationship. *Bioorg Med Chem.* 2006; 14: 938-943
- Eldeen IMS, Van Heerden FR, Van Staden J. (2007) Biological activities of cycloart-23-ene-3,25-diol isolated from the leaves of *Trichilia dregeana*. *S Afr J. Bot.* In Press, Corrected Proof, Available online 28 March.
- Bentley MD, Rajab MS, Mendel MJ, Alford AR. Limonoid Model Insect Antifeedants. *J Agric Food Chem.* 1990; 38: 1400-1403.
- Powell R, Mikolajczak K, Zilkowski B. Limonoid antifeedants from seed of *Sandoricum koetjape*. *J Nat Prod.* 1991; 54(1); 241-246.